Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. F. Haffner

Die Auswertung von Stoffen der Atropingruppe am Froschherz

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

SIGMUND FRICK
aus Bentschen

1938

Buchdruckerei Albert Becht, Tübingen, Hirschgasse 16

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Dekan: Professor Dr. Usadel

Berichterstatter: Professor Dr. Haffner

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Zur Auswertung atropinhaltiger Präparate wurden verschiedene Methoden angegeben. Die pupillenerweiternde Eigenschaft wurde von Heubner (1) an der Katze angewandt. Pulewka (2) hat vor einiger Zeit an der weißen Maus ein Verfahren ausgearbeitet, das mit Hilfe der statistischen Erfassung der Pupillenwirkung eine genaue Auswertung erlaubt. Weiterhin diente der Antagonismus zwischen Parasympathikuserregung und -lähmung zu Auswertungen. Nolle (3) hat für den isolierten Froschmuskel ein Auswertungsverfahren angegeben, das die Aufhebung der unter Cholin eintretenden Zuckung durch Atropin zur Grundlage hat. Besonders leicht zu zeigen ist dieser Antagonismus am isolierten Froschherz. Kirste (4) und Fernandez (5) benutzten die Aufhebung des durch Muskarin bzw. Acetylcholin herbeigeführten Stillstandes. Als Maß diente dabei der Zeitabstand zwischen dem Zusatz einer Atropinsubstanz auf das stillgestellte Herz und Einsetzen der Atropinwirkung. Um mehrere Versuche an einem Präparat vornehmen zu können, sind jedoch sehr gründliche Spülungen des Präparates und lange Erholungszeiten notwendig. Andererseits haben die Versuche am Froschherzen aber den großen Vorteil gegenüber den Versuchen am ganzen Tier, daß es gelingt, an ein und demselben Präparat mehrere Untersuchungen vornehmen zu können. Dadurch ist der Faktor der individuellen Empfindlichkeit weithin ausgeschaltet.

Am hiesigen Institut wurde nun durch Dr. Schmid (7) ein anderer Weg zur Untersuchung am Froschherzen ausgearbeitet. Dabei wird zuerst die Atropinlösung zur Einwirkung auf das Herz gebracht und erst dann Acetylcholin. Die nun eintretende Erniedrigung wird als Maß für die Stärke der Atropinwirkung benutzt. Schmid gibt dabei eine gleichbleibende Acetylcholinmenge, die ohne vorherige Atropinzugabe das Froschherz eben zum Stillstand bringt. Je nach der herrschenden Atropinkonzentration entstehen deutlich unterscheidbare Erniedrigungen der Hubhöhe.

Man wählt die Atropinkonzentrationen so, daß keine zu tiefe Erschlaffung eintritt. Auf diese Weise sind dann auch bei wiederholten Versuchen Vergleiche und damit Auswertungen von Atropinsubstanzen möglich.

Im folgenden soll auf Anregung von Prof. Haffner die Methode zur Auswertung einer Reihe von Substanzen und Präparaten der Atropinreihe benutzt werden.

Methode.

Die Versuche wurden mit der von Straub angegebenen Anordnung für Untersuchungen am isolierten Froschherzen durchgeführt. Die Schreibung der Herztätigkeit erfolgte auf einer langsam laufenden berußten Trommel. Durch die enge Schreibung lassen sich Veränderungen in der Hubhöhe, worauf es bei diesen Versuchen ankam, besonders gut ablesen und vergleichen.

Als Nährlösung diente eine Ringerlösung folgender Zusammensetzung:

NaCl	0,6 %
KCl	0,01 %
$CaCl_2$	0,02 %
$NaHCO_3$	0,01 %

Dazu wurde vor jedem Versuch eine Phosphatpufferlösung (sekundäres zu primärem Phosphat wie 3 : 1) hinzugegeben. Die Endkonzentration in der Ringerlösung war $^1/_{75}$ Molar. Im Verlauf der Versuche zeigte sich, daß dieser Zusatz eine größere Reihe von Versuchen am gleichen Präparat zuließ, als dies bei einer nichtgepufferten Lösung der Fall war.

Als Standardlösung diente eine genau hergestellte 1 % Atropinlösung, die alle 14 Tage bis längstens 3 Wochen erneuert wurde. Sie wurde vor Licht geschützt und kühl aufbewahrt. Daraus wurden vor jeder Versuchsreihe die notwendigen Verdünnungen frisch hergestellt, gewöhnlich mit dem Faktor 2 und 1,5. Als Antagonist diente eine 1 %-Lösung von Acetylcholin-Roche (hergestellt aus Trockenampullen). Die Lösung behielt bei kühler

Aufbewahrung zum mindesten 14 Tage lang eine gute, nur wenig herabgesetzte Wirksamkeit.

Von der gepufferten Ringerlösung wurde jeweils 1 ccm in die Herzkanüle gegeben. Die Menge der zugesetzten Agentien betrug jeweils 0,05 ccm und wurde mit einer in 0,01 ccm graduierten Pipette abgemessen. Vor jeder Substanzzugabe wurde gründlich mit Luft durchgemischt.

Ein Versuch verlief folgendermaßen: Zuerst wurde Atrop. sulf. oder die zu untersuchende Substanz in die vorgelegte Ringerlösung gegeben und kurz durchgemischt. Ohne Pause wurde darnach Acetylcholin gegeben und wieder durchgemischt. Nun wurde solange gewartet, bis die Hubhöhe auf ein gleichbleibendes Niveau abgesunken war. Dann wurde ausgespült, bis die alte Höhe wieder erreicht war, und die Ringerlösung noch mehreremal erneuert. Die Pause bis zum nächsten Versuch betrug im Durchschnitt 5 Minuten. Diese Wartezeit erwies sich als ausreichend zur völligen Erholung. Das Kymographion wurde in der Wartezeit abgestellt. Auf diese Weise konnten ausschließlich der Einstellungswerte 12 und mehr Einzelversuche an einem Präparat durchgeführt werden. Zu Beginn einer Versuchsreihe waren 3—4 Einzelversuche notwendig, bis die Empfindlichkeit gegenüber Acetylcholin gleichblieb. Dabei zeigte es sich als vorteilhaft, das erstemal eine so starke Acetylcholindosis zu verabreichen, daß eben noch ein Herzstillstand eintrat. Es wurde zunächst von der zu untersuchenden Substanz ein vergleichbarer Wert gesucht, dann dieser in wiederholten Versuchen zwischen gleiche und verschieden abgestufte Atropinkonzentrationen eingeklammert. Das gefundene Ergebnis wurde gewöhnlich an zwei weiteren Herzpräparaten kontrolliert.

Zu den Versuchen wurden männliche und weibliche Tiere von Rana esculenta und temporaria verwendet. Innerhalb der Rasse war zwischen den männlichen und weiblichen Tieren kein Unterschied in der Empfindlichkeit festzustellen. Dagegen zeigte sich eine Abhängigkeit von der Größe. Mittelgroße Tiere sind am geeignetsten. Herzen von großen Tieren sind zu labil. Bei Rana temporaria zeigten sich starke Schwankungen je nach dem Allgemeinzustand der Tiere. Im Frühjahr und Herbst frisch gefangene Tiere erwiesen sich als sehr ge-

eignet, während Hungertiere besonders in den Sommermonaten unbrauchbar sind. Von Rana esculenta standen immer frische Fänge zur Verfügung. Bei ihnen konnte man keine jahreszeitliche Schwankung feststellen. Im ganzen sind jedoch Rana temporaria mehr zu empfehlen, da ihre Empfindlichkeit gegen Atropinabstufungen etwas größer ist als die von R. esculenta.

Als günstigste Verdünnung für die Versuche fanden wir bei Acetylcholin im Mittel 1 : 10 000, bei Atropin lag die Konzentration, mit der gearbeitet wurde, zwischen 1 : 100 000 und 800 000. Davon wurden jeweils 0,05 ccm auf 1 ccm Ringerlösung gegeben, sodaß die verwendete Menge im Mittel $^1/_{10}$ je betrug.

Verdünnungen mit dem Quotienten 2 geben gut ablesbare Unterschiede in den Erniedrigungen. Man kann dazwischenliegende Werte noch deutlich davon trennen. Bei genauer Auswertung kann man die Abstufungen bis zum Quotienten 1,25 vornehmen. Die Genauigkeitsgrenze der Methode liegt bei ± 10—15 %. Die Grenze der Nachweisbarkeit von Atropin liegt bei dieser Methode bei $^1/_{100}$ γ.

Untersuchungsergebnisse.

Als erstes wurde Hyoscyamin untersucht. Bekanntlich ist Atropin das Razemprodukt aus d- und l-Hyoscyamin. Es ist bereits an verschiedenen Testobjekten nachgewiesen worden, daß die parasympathisch lähmende Wirkung bei l-Hyoscyamin 30mal stärker ist als bei d-Hyosyamin, das bedeutet, daß die Wirksamkeit von Atropin praktisch durch l-Hyoscyamin bedingt ist. Wir konnten dies bei einer größeren Reihe von Untersuchungen bestätigen und fanden mit unserer Methode ebenfalls, daß Hyoscyamin zweimal so stark ist wie Atropin.

Homatropin wirkt, der klinischen Erfahrung entsprechend, erheblich weniger stark wie Atropin.

Bei Skopolamin fanden wir nur halb so starke Wirksamkeit wie bei Atropin. Hier besteht noch eine ungeklärte Differenz zu der Angabe von Führer (6) und Pulewka (8), die Skopolamin am Auge wesentlich wirksamer wie Atropin fanden.

Vielleicht spielt bei den Versuchen am Auge neben der Wirkung an sich auch noch die Resorptionsfähigkeit eine Rolle.

Weiterhin wurden mehrere quarternäre Ammoniumbasen des Atropins untersucht. Die Alkylierung des Stickstoffs bedingt eine wesentliche Verstärkung der curareartigen Wirkung des Atropins. Es war nun besonders interessant festzustellen, welche Bedeutung die Alkylierung des Stickstoffs für die Wirkung auf den Parasympathikus hat. Es ergab sich, daß die Veränderung der Wirkung sehr abhängig von der Art des Alkyls ist. So wirkten die N-Benzylderivate des Hyoscyamins und Atropins wesentlich schwächer, dagegen das N-Methylderivat, welches als Eumydrin in die Therapie eingeführt ist, wesentlich stärker. Es wäre interessant auch die klinische Wirkung des Eumydrins einmal quantitativ gegen Atropin zu vergleichen.

Lobelin wirkt an sich auf das Froschherz schädigend. Es war jedoch möglich, nachdem die Schädigung genau festgelegt war, mit Acetylcholin weitere meßbare Erniedrigungen zu setzen und auszuwerten. Dabei zeigte sich, daß Lobelin nur eine geringe parasympathisch lähmende Wirksamkeit besitzt.

Syntropan ist ein rein synthetisches Produkt, welches den Vorteil vor Atropin haben soll, weniger stark die sekretorische Funktion zu lähmen. Seine Wirksamkeit liegt jedoch in ganz anderen Größenordnungen.

Eingehende Versuche wurden mit verschiedenen Belladonnaextrakten gemacht. Vor allem wurde die Wirksamkeit nach längerem Lagern untersucht. Die Präparate wurden von Apotheker Dr. Schultz am hiesigen Institut nach der Vorschrift des DAB VI titrimetrisch auf ihren Alkaloidgehalt untersucht. Der geforderte Alkaloidgehalt von 1,48 bis 1,52 war in allen Fällen vorhanden. Zu den Versuchen diente uns aus dem Großhandel frisch bezogenes Extractum Belladonnae Merck und ein Merckscher Präparat, das ohne besondere Vorsichtsmaßregel im Institut ein Jahr lang aufbewahrt war, sowie einige Extrakte, die uns von den Apotheken Schweyer-Dornstetten und Kleinknecht-Metzingen in entgegenkommender Weise zur Verfügung gestellt worden waren. Es zeigte sich, daß von

den beiden Merckschen Präparaten der frischbezogene den zu fordernden Wirkungswert besaß, das alte dagegen wesentlich schwächer wirkte und annähernd bei dem Wert lag, der bei vollkommener Racemisierung des l-Hyoscyamins zu erwarten war. Auch die von den beiden Apotheken bezogenen Frischpräparate besaßen die volle dem Hyoscyamingehalt entsprechende Wirksamkeit. Dagegen waren die in der Apotheke selbst länger gelagerten Präparate trotz gleichgebliebenen Titrationswerts in ihrer biologischen Wirksamkeit deutlich zurückgegangen. So war z. B. ein ½ Jahr alter Extrakt nur noch halb so wirksam wie ein frischer. Demnach ist es also wichtig, daß neben der chemischen Kontrolle auch eine biologische Auswertung bei Belladonnaextrakten einsetzt.

Weiterhin wurde eine Reihe anderer galenischer Zubereitungen ausgewertet. So fand sich z. B., daß die homöopathische Urtinktur den gleichen Atropingehalt hat wie die gewöhnliche Tinktura Belladonnae. Das gleiche traf auch für Hyoscyamus-Tinktur und -Urtinktur zu. Aus dem als Einreibemittel empfohlenen Oleum Hyoscyami ließ sich noch eine, allerdings kleine, Menge wirksamen Alkaloids extrahieren.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Gehalt von Brosig's Asthmazigaretten (Stramoniumzigaretten) und verschiedene Zubereitungen von Stramoniumdrogen geprüft.

Gehalt der Stramoniumzigaretten, bestimmt in einer Maceration aus 1 g Zigarettensubstanz (= 2 Zigaretten): 1 g Brosig's Asthmazigarettensubstanz wurde mit 10 g Spirit. dilut. 14 Stunden hindurch bei einer Temperatur von durchschnittlich 30° ausgezogen. Hernach erfolgte eine einstündige Digestion bei 43°. Nach Erkalten wurde die Substanz unter leichtem Druck filtriert und der abgedampfte Spiritus ergänzt. Die Auswertung der Maceration ergab einen Alkaloidgehalt für 1 Zigarette, der der Wirksamkeit von 1 mg Atropin entspricht.

Gehaltsbestimmung des Rauches von Brosig's Asthmazigaretten: Es wurde eine Zigarette (= ½ g Substanz) mittels Wasserstrahlpumpe in 8 Minuten gleichmäßig langsam, entsprechend der durchschnittlichen Verrauchzeit einer gewöhnlichen Zigarette verraucht. Der Rauch wurde durch eine Wasch-

flasche, in welcher 10 ccm n/20 HCl vorgelegt waren, gesaugt. Die überschüssige Säure wurde mit 0,4 ccm n/1 NaOH neutralisiert. In dem gesamten Rauch, der beim Abbrennen durch die Vorlage gezogen wurde, wurde ein Alkaloidgehalt gefunden, der 1/40 mg Atropin entspricht. In den Rauch sind also 0,25 % übergegangen, eine Menge, von der bei der raschen Resorption in den Luftwegen wohl eine Wirkung zu erwarten ist. Unsere Werte stimmen mit denen von Fernandez (5) durchaus überein.

Eine Maceration aus fein zerriebenen Stramoniumblättern, die auf gleiche Art wie die Maceration aus 1 g Zigarettensubstanz hergestellt war, enthielt die Hälfte der in der Zigarettenmaceration gefundenen Alkaloidmenge, d. h. eine Wirksamkeit, die 1,0 mg Atropin pro 1 g Blätter entsprach gegenüber 2,0 mg pro 1 g Zigaretten.

Von denselben Blättern wurden eine Tinktur und ein Alkaloidauszug hergestellt (der letzte nach Vorschrift des DAB VI für die Alkaloidbestimmung); sie erwiesen sich als gleich wirksam wie die Maceration aus den Stramoniumblättern.

Die einzelnen Ergebnisse sind am Schluß der Arbeit in einer Tabelle zusammengefaßt.

Wirksamkeit atropinähnlicher Substanzen

(auf gleiche Gewichtsteile Atropin. sulf. bezogen).

Präparate	relativer Wirkungswert in %	chem. Alkaloidgehalt in %
Atropin. sulf.	100	100
Hyoscyamin	200	100
Homatropin	5	
Scopolamin	50	
N-methyl-Atropinnitric. = Eumydrin	200	
N-methyl-Atropinbromid	150	
N-benzyl-Atropinchlorid	10	
N-benzyl-Hyoscyaminbromid	25	
Lobelin (Boehringer)	0,25	
Tinctura Lobeliae	0	
Syntropan	0,5	
Extractum Belladonnae Schweyer frisch	3	1,5
„ „ Ders. nach 1/2 Jahr	2,5	1,5
„ „ 1/2 Jahr alt	1,5—2	1,5
„ „ Kleinknecht 3/4 Jahr alt	2,4—3	1,5
„ „ Merck frisch	3	1,5
„ „ im Inst. aufb. 1 Jahr alt	1,5—2	1,5
Tinctura Belladonnae	0,08	0,03
Belladonna Urtinctur	0,08	0,05
Tinctura Hyoscyami	0,002	
Hyoscyamus Urtinctur	0,002	
Oleum Hyoscyami	0,00125	
Tinctura Stramonii e semin.	0,13	
Stramonium Urtinctur	0,1	
Solanum nigrum Urtinctur	0,02	
Fol. Stramon.	0,1	
Brosig's Asthmazigt. *)		
Zigt. substanz	0,2	

*) [1 Zigarette = 1,0 mg Atr.]
[Rauch einer Zigarette = 0,025 mg Atr.]

Zusammenfassung:

Es wurde die von Dr. Schmid ausgearbeitete Auswertungsmethode von Atropinpräparaten am isolierten Froschherzen nachgeprüft und dabei ihre Brauchbarkeit bestätigt. Es zeigte sich, daß sich noch Atropinmengen bis zu $^1/_{100}$ γ nachweisen lassen bei einer Genauigkeit von ± 15 %.

Literaturverzeichnis.

(1) Heubner, Quantitative Bestimmung von Atropin neben Papaverin in einer Arznei. Klin. Woschr. 1926, S. 1571.

(2) Pulewka, Das Auge der weißen Maus als pharm. Testobjekt. I. Mitteilung: Eine Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Mengen Atropin und anderer Mydriatika. Arch. f. experim. Path. und Pharm. 168/307.

(3) Nolle, Ueber die Wertbestimmung der Belladonna. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 143/184.

(4) Kirste, Ueber den Synergismus von Atropin und Blutserum am muscarinvergifteten Froschherz. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 89/106.

(5) Fernandez, Die pharmakologische Gehaltsbestimmung von Atropinlösungen. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 127/197.

— —, Nachweis und Bestimmung des Atropin im Rauche von Stramoniumzigaretten. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 127/204.

(6) Führer, Nachweis von Giften auf pharmakologischem Wege: Der Nachweis von Atropin, Skopolamin und Physostigmin am Katzenauge. Abderhalden, Handbuch der biol. Arbeitsmethoden 1922, Abt. IV, 7, 1, S. 599.

(7) Schmid, W., Verhandlungen der deutschen pharmakol. Gesellsch., 13. Tagung. 1936.

(8) Pulewka, Ueber die Wertbestimmung von Heilmitteln, welche atropinartige Stoffe enthalten. Arch. f. experim. Path. u. Pharm. 180, S. 119.

Lebenslauf.

Am 25. September 1912 wurde ich, Sigmund Paul Otto Frick, als Sohn des Dr. phil. Otto Frick, Leiter der Städtischen Höheren Schule in Bentschen, ehemalige Provinz Posen, und seiner Ehefrau Fridericke geb. Schäfer, geboren. Nach abgeschlossener Gymnasialausbildung, zuletzt im Seminar Maulbronn-Blaubeuren, begann ich 1931 mit dem Studium der Medizin in Tübingen. 1934/1935 unterbrach ich mein Studium, um ein Jahr bei der Reichswehr zu dienen. Seit WS. 1935/36 studierte ich wieder in Tübingen. Das Physikum legte ich im Juli 1933 und das Staatsexamen Herbst 1937 ab.